

09/508828

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP98/5924 41

REC'D 20 NOV 1998
WIPO PCT

Bescheinigung

Die PRIONICS AG in Zürich/Schweiz hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Synthetische Polypeptide zur Diagnose und Thera-
pie von Prionerkrankungen"

am 20. September 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

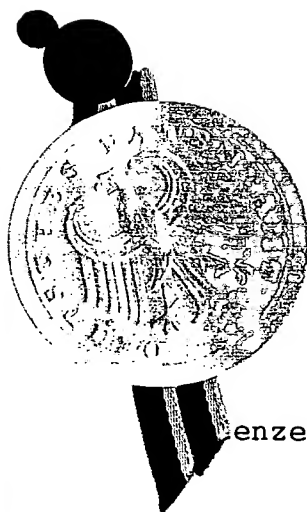
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 K, A 61 K und G 01 N der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 22. September 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Hoiß



Zeichen: 197 41 607.1

Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

19. September 1997

Prionics AG,

Universität Zürich, Winterthurerstr. 190, CH-8057 Zürich

ZUSAMMENFASSUNG

Synthetische Polypeptide zur Diagnose und Therapie von Prionerkrankungen

Synthetisches Polypeptid, das eine oder mehrere definierte Sequenzen von PrP oder davon abgeleitete Sequenzen enthält, die von PrPSc - bindenden Substanzen erkannt werden.

**Patentanwälte
Schaefer & Emmel**

European Patent Attorneys

H 2 5 . 0 9 . 0 9
Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000
Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

19. September 1997

Prionics AG,

Universität Zürich, Winterthurerstr. 190, CH-8057 Zürich

PATENTANSPRÜCHE:

1. Synthetisches Polypeptid, das eine oder mehrere definierte Sequenzen von PrP oder davon abgeleitete Sequenzen enthält, die von PrP^{Sc} - bindenden Substanzen erkannt werden.
2. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem die Sequenz einer der folgenden Formeln entspricht und mind. eine der genannten Sequenzen oder eine Kombination mehrerer Sequenzen enthalten ist:
 - a) Gly-R₁-Asp-R₂-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)
 - b) (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R₃-Pro- R₄-Asp-R₅-Tyr- R₆-(Asn-Gln)
 - c) Cys-R₇-Thr-Gln-Tyr-R₈-R₉-Glu-Ser-R₁₀-Ala-(R₁₁-Tyr)
 - d) (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R₁₂-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in denen R₁ = Asn oder Ser, R₂ = Trp oder Tyr, R₃ = Arg oder Lys, R₄ = Met, Val oder Ala, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn, R₇ = Val,

Thr oder Ile, R₈ = Gln oder Glu, R₉ = Lys, Arg oder Gln, R₁₀ = Gln oder Glu, R₁₁ = Tyr, Ser oder Ala und R₁₂ = His, Tyr oder Asn ist und die in Klammern angegebenen Aminosäuren nicht zwingend vorhanden sind.

3. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem die Sequenz einer der folgenden Formeln entspricht und mind. eine der genannten Sequenzen oder eine Kombination mehrerer Sequenzen enthalten ist:
 - e) Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly
 - f) Lys-Pro-R₁₄-Lys-Pro-Lys-Thr-R₁₄-R₁₅-Lys-His-R₁₆-Ala-Gly
 - g) Tyr-R₁₆-Leu-Gly-Ser
 - h) Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro-R₁₇-R₁₇-His-Phe-Gly-R₁₄-Asp
 - i) Asn-Met-R₁₈-Arg-Tyr-(Pro-R₁₄)-(Gln-Val-Tyr-Tyr-R₁₉)

in denen R₁₄ = Asn oder Ser, R₁₅ = Met, Leu oder Phe, R₁₆ = Met oder Val, R₁₇ = Ile, Leu oder Met, R₁₈ = His, Tyr oder Asn und R₁₉ = Lys oder Arg ist, und die in Klammern angegebenen Aminosäuren oder Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sind.

4. Synthetisches Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz ggf. über eine übliche Spacersequenz mit einer "Konformations"-sequenz gekoppelt ist, die die Ausbildung einer definierten Konformation des synthetischen Polypeptids induziert.
5. Synthetisches Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die "Konformations"-sequenz die Ausbildung eines β -Strands induziert.

6. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 2, 4 und 5 entsprechend einer der folgenden Formeln :
 - e) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-Z-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-(Y)
 - f) (X)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-(Y)wobei X und Y beliebige Aminosäuresequenzen sind, Z ein üblicher Spacer z.B Gly-Gly ist, R₃ = Arg oder Lys, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn und R₁₃ = Met oder Val ist, und die in Klammern gesetzten Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sein müssen.
7. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es in mindestens einer Teilsequenz in retro-Form vorliegt.
8. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der enthaltenen Aminosäuren in der D-Form vorliegt.
9. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es in derivatisierter Form vorliegt.
10. Pharmazeutische Zubereitung zur Therapie von Prionerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eines der in den Ansprüchen 1 - 9 genannten synthetischen Polypeptide oder mind. eine die definierten Sequenzen erkennende PrP^{Sc}-bindende Substanz in einer zur Therapie oder Vorbeugung ausreichenden Dosis enthält.

11. Mittel zur Diagnose von Prionerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eines der in den Ansprüchen 1 - 9 genannten synthetischen Polypeptide oder mind. eine die definierten Sequenzen erkennende PrP^{Sc}-bindende Substanz in einer für den jeweiligen Nachweis ausreichenden Dosis enthält.
12. Impfstoff zur Vorbeugung und Therapie von Prionerkrankungen mit mindestens einem der Polypeptide gemäß den Ansprüchen 1 - 9 oder mind. einer die definierten Sequenzen erkennende PrP^{Sc}-spezifischen Substanz in einer zur Immunisierung ausreichenden Dosis.
13. Pharmazeutische Zubereitung, Mittel zur Diagnose oder Impfstoff nach einem der Ansprüche 9-12, dadurch gekennzeichnet, daß die enthaltene PrP^{Sc} -bindende Substanz rekombinant erzeugtes rbPrp mit der in Fig 4 wiedergegebenen Formel bzw. artspezifischer Abweichungen davon ist.
14. DNA-Molekül, das mindestens für eines der synthetischen Polypeptide nach den Ansprüchen 1 bis 9 kodiert.
15. Kit zur Detektion von PrP^{Sc} bzw. von Antikörpern dagegen, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens ein synthetisches Polypeptid nach den Ansprüchen 1 bis 9 enthält.
16. Verfahren zur Herstellung von PrP^{Sc} spezifischen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß nicht-menschliche Säugetiere mit mind. einem Polypeptid gemäß der Ansprüche 1-9 immunisiert werden und der bzw die dagegen gebildete(n) Antikörper nach einer zur Immunisierung ausreichenden Zeitperiode auf üblichem Wege aus dem Säugetier isoliert werden.

17. Verfahren zur Detektion von PrP^{Sc} spezifischen Oberflächensequenzbereichen, dadurch gekennzeichnet, daß eine PrP-spezifische Peptidbank mit PrP^{Sc} bindenden Substanzen inkubiert und mittels gängiger Visualisationstechniken die bindenden Bereiche der Peptidbank sichtbar gemacht und daraus die Sequenzbereiche ermittelt werden.
18. Verwendung der Polypeptide nach den Ansprüchen 1-9 in einer pharmazeutischen oder chemischen Library zur Detektion von von PrP^{Sc} - spezifischen Wirkstoffen.

**Patentanwälte
Schaefer & Emmel**

European Patent Attorneys

M 35 04 93
Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Gchölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000
Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

19. September 1997
Our Ref.: 01637

PRIONICS AG

Universität Zürich, Winterthurerstr. 190, CH-8057 Zürich

Synthetische Polypeptide zur Diagnose und Therapie von Prionerkrankungen

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf synthetische Polypeptide, die insbesondere bei der Diagnose, Vorbeugung und Behandlung von einer Reihe von übertragbaren, degenerativen neurologischen Erkrankungen Verwendung finden können. Diese Erkrankungen werden unter dem Begriff spongiforme Enzephalopatienten oder auch Prionerkrankungen zusammengefaßt. Sie treten in unterschiedlichen Säugetierspezies auf, z.B. als Scrapie bei Schafen, als BSE bei Kühen und als Kuru oder Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bei Menschen.

Als einziges mit dem infektiösen Agens assoziiertes Molekül wurde bislang ein krankheitsspezifisches Prionprotein (PrP^{Sc}) gefunden, das eine abnorme Isoform eines normalen Wirtsproteins (PrP^C) unbekannter Funktion ist. Beide Isoformen PrP^{Sc} und PrP^C stimmen bezüglich Molekulargewicht und Aminosäuresequenz überein. Sie unterscheiden sich in ihrer räumlichen Faltung und ihren Eigenschaften. Während z.B. PrP^C überwiegend α -helicale Sekundärstrukturen besitzt,

löslich und proteaseverdaulich ist, weist PrP^{Sc} vor allem β -Faltblattstrukturen auf, ist unlöslich und kann von Proteasen nur teilweise abgebaut werden. Viele Indizien, insbesondere die Abwesenheit von anderen Molekülen außer PrP^{Sc} im Prion, und vor allem die Abwesenheit von Nukleinsäuren, deuten darauf hin, daß PrP^{Sc} eine (wenn nicht die) zentrale Rolle bei der Auslösung der oben genannten Krankheiten zukommt. Es wird angenommen daß PrP^{Sc}-Proteine in der Lage sind, normale PrP^C-Proteine in die krankheitsspezifische Faltung zu konvertieren, was die Infektiosität von PrP^{Sc}-Proteinen erklären würde.

Es scheint daher vielversprechend ausgehend von PrP^{Sc} als zentralem Krankheitsmolekül Therapie- oder Diagnosemöglichkeiten zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist in diesem Zusammenhang, synthetische Polypeptide bereitzustellen, die immunogene Eigenschaften oder generell Bindungseigenschaften des PrP^{Sc} nicht jedoch dessen Infektiosität aufweisen.

Gelöst wird die Aufgabe mit synthetischen Polypeptiden entsprechend des Anspruches 1.

Es handelt sich dabei um Polypeptide, die eine oder mehrere definierte Sequenzen des PrP (PrP bezeichnet das Prionprotein im allgemeinen unabhängig von seiner Konformation) enthalten, wobei diese Sequenzen von PrP^{Sc}-bindenden Substanzen in z.B. den weiter unten beschriebenen Mapping-Experimenten erkannt werden. Es gibt eine ganze Reihe von unterschiedlichen PrP^{Sc}-spezifisch bindenden Substanzen. Beispiele hierfür sind weiter unten angegeben.

Zusammengefaßt enthalten die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide damit mindestens eine Sequenz, die im nativen PrP^{Sc} an dessen Oberfläche an-

geordnet ist und dort alleine oder in Verbindung mit weiteren der im Rahmen der Erfindung einsetzbaren Sequenzen eine Bindungsstelle bilden. An der Ausbildung dieser PrP^{Sc}-spezifischen Oberflächenstrukturen ist mindestens eine der beiden im Strukturmodell des rekombinanten PrP vorhandenen β -Faltblattstrukturen, oder beide, beteiligt. Es wird angenommen, daß diese Strukturen im PrP^{Sc} als Nukleationspunkt bei der Ausbildung der Oberfläche einen dominierenden Einfluß haben.

Künstliche Polypeptide, die im nativen PrP^{Sc} vorhandene Bindungsstellen simulieren, können sowohl zur Therapie oder Diagnose als auch zur Vorbeugung und sonstigen Anwendungszwecken von Interesse sein.

Unter die Erfindung fallen insbesondere synthetische Polypeptide, die einen oder mehrere der im Anspruch 2 genannten folgenden Sequenzbereiche aufweisen:

- a) Gly-R₁-Asp-R₂-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)
- b) (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R₃-Pro- R₄-Asp-R₅-Tyr- R₆-(Asn-Gln)
- c) Cys-R₇-Thr-Gln-Tyr-R₈-R₉-Glu-Ser-R₁₀-Ala-(R₁₁-Tyr)
- d) (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R₁₂-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in denen R₁ =Asn oder Ser, R₂ = Trp oder Tyr, R₃ = Arg oder Lys, R₄ = Met, Val oder Ala, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn, R₇ = Val, Thr oder Ile, R₈ = Gln oder Glu, R₉ = Lys, Arg oder Gln, R₁₀ = Gln oder Glu, R₁₁ = Tyr, Ser oder Ala und R₁₂ = His, Tyr oder Asn ist und die in Klammern angegebenen Aminosäuren nicht zwingend vorhanden sind.

Weitere synthetische Polypeptide im Rahmen der Erfindung können nach Anspruch 3 eine oder mehrere der folgenden Sequenzen enthalten:

- e) Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly
- f) Lys-Pro-R₁₄-Lys-Pro-Lys-Thr-R₁₄-R₁₅-Lys-His-R₁₆-Ala-Gly
- g) Tyr-R₁₆-Leu-Gly-Ser
- h) Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro-R₁₇-R₁₇-His-Phe-Gly-R₁₄-Asp
- i) Asn-Met-R₁₈-Arg-Tyr-(Pro-R₁₄)-(Gln-Val-Tyr-Tyr-R₁₉)

in denen R₁₄= Asn oder Ser, R₁₅= Met, Leu oder Phe, R₁₆=Met oder Val, R₁₇= Ile, Leu oder Met, R₁₈= His, Tyr oder Asn und R₁₉= Lys oder Arg ist und die in Klammern gesetzten Aminosäuren oder Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sind.

Die Sequenzen gemäß Anspruch 2 und 3 wurden in sogenannten "Mapping-Experimenten" auf einer immobilisierten Peptidbank gefunden. Auf der benutzten Peptidbank (erhältlich von Jerini Biotoools, Berlin) sind 104 Peptide mit jeweils 13 Aminosäuren mit ihrem C-terminalen Ende auf einer Cellulosemembran befestigt. Sie decken die gesamte Sequenz des PrP (PrP bezeichnet im folgenden generell die dem Prionprotein zugrundeliegende Aminosäuresequenz unabhängig von der Konformation) ab und sind so angeordnet, daß sie um jeweils zwei Aminosäuren verschoben sind, d.h. jeweils 11 Aminosäuren zwischen zwei benachbarten Peptiden überlappen. In mehreren Mapping-Experimenten wurden Peptidbanken mit unterschiedlichen PrP^{Sc} bindenden Substanzen beaufschlagt und die Bindung dieser Substanzen an spezielle Sequenzbereiche unter Verwendung z.B. eines Chemolumineszenz-Kits (ECL, Amersham, USA) sichtbar gemacht.

Zur Ermittlung der Sequenzen gemäß Anspruch 2 wurden in "Mapping-Experimenten" als PrP^{Sc}-bindende Substanzen ein PrP^{Sc}-spezifischer Antikörper mit der Bezeichnung 15B3 und (wie in eigenen Vorversuchen gezeigt wurde

ebenfalls PrP^{Sc}-spezifisches) rekombinantes bovines-PrP (rbPrP) mit der in Fig 4 angegebenen Sequenz eingesetzt. Zur Herstellung von rbPrP kann z.B. eine Zelllinie (z.B. E. coli) mit einem Vektor, der rbPrP exprimiert, in einem geeigneten Medium (z.B. Luria-Broth) angezogen und dann aus den Inklusionskörpern der Zellen nach Lysis und weiteren konventionellen Reinigungsmethoden das Prion-Protein isoliert werden (siehe auch Hornemann et al., FEBS-Letters (97) 413 (2; 277-281)).

Bei 15B3 handelt es sich um einen unlängst von den Erfindern entdeckten monoklonalen PrP^{Sc}-Antikörper. Hybridomazellen, die die genannten (PrP^{Sc} spezifischen) Antikörper 15B3 produzieren, wurden am 13. Februar 1997 unter der Nummer DSM ACC2298 bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig hinterlegt.

In beiden Fällen erkannten die beiden unterschiedlichen bindenden Substanzen, der Antikörper 15B3 und das rekombinante rbPrP übereinstimmend die Sequenzen a-d gemäß Anspruch 1, wie für 15B3 in Fig. 1 und für rbPrP in Fig. 2 wiedergegeben.

Die in Fig 1 und 2 angegebenen Nummern bezeichnen die unterschiedlichen Peptidsequenzen der Bank, an denen der monoklonale Antikörper 15B3 bzw rbPrP bindet. Die erfindungsgemäßen Sequenzen entsprechen dabei jeweils den den jeweiligen räumlich benachbarten Bindungspeptiden gemeinsamen Bereichen. Fig. 2 gibt dabei wie bereits erwähnt das Ergebnis eines Mappingexperimentes wieder, dessen Bedingungen dem in Fig. 1 dargestellten Experiment entsprechen. Hier wurde lediglich der Antikörper 15B3 gegen rekombinantes bovines rbPrP ausgetauscht. Die Bindungsstellen des rekombinanten rbPrP sind auf der aus technischen Gründen nicht besser wiederzugebenden Darstellung mit

Markierungen hervorgehoben. Es handelt sich um mit Fig. 1 übereinstimmende Bindungsstellen.

Die in Anspruch 3 angegebenen Sequenzen wurden ebenfalls mittels Mappingexperimenten ermittelt. Allerdings wurde hier als erkennende Substanz nicht ein Antikörper oder rbPrP, sondern der Farbstoff Kongorot eingesetzt, dessen spezifische Bindung für PrP^{Sc} bereits seit längerem bekannt ist (Prusiner et al., Cell 35, 349-358; 1983). Fig. 3 zeigt die entsprechende Peptidbank mit den angefärbten Bindungsbereichen, aus denen wie oben angegeben die Sequenzen e-i ermittelt wurden.

In den Fig. 1-3 erkennt man, daß es sich bei den Sequenzen a-d bzw e-i um nicht linear zusammenhängende Sequenzen aus PrP handelt. An einem 3-dimensionalen Modell eines C-terminalen Fragments von rekombinantem Maus-PrP konnte gezeigt werden, daß sich hier zwei der im Anspruch 2 angegebenen Sequenzen a-d in räumlicher Nähe zueinander befinden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist davon auszugehen, daß bei der Konformationsänderung auch die beiden anderen Sequenzen eine andere Position einnehmen, dergestalt daß im PrP^{Sc} wohl alle vier Sequenzen a-d benachbart angeordnet sind und mit hoher Wahrscheinlichkeit ein konformationelles Epitop ausbilden.

Die beanspruchten Sequenzen stellen damit Sequenzbereiche dar, die in einer Peptidbank einzeln von z.B. einem PrP^{Sc}-spezifischen Antikörper erkannt werden und die darüber hinaus mit hoher Wahrscheinlichkeit im nativen PrP^{Sc}-Protein einzeln oder zu mehreren einen oberflächlichen Bindungsbereich, z.B. ein Epitop ausbilden. Unter Epitop wird der spezifische antigene Ort auf der Oberfläche des PrP^{Sc}-Proteins verstanden, der z.B. durch das Idiotyp von 15B3 gebunden werden kann.

Erfindungsgemäß werden damit synthetische Polypeptide bereitgestellt, die im Mindestfall eine der von den genannten PrP^{Sc} bindenden Substanzen in der Peptidbank erkannten Sequenzen (sowie möglicherweise zusätzliche) enthalten.

Künstliche Polypeptide, die einen antigenen Bereich von PrP^{Sc} aufweisen, sind bereits in der WO 93/11153 angegeben worden. Die dort genannten Sequenzen stellen relativ umfangreich Ausschnitte aus der PrP-Sequenz dar. Die genaue Abgrenzung einer Sequenz, die z.B. ein Epitop ausbildet oder daran beteiligt ist, fehlt, was insbesondere den räumlichen Nachbau von minimalen synthetischen Polypeptiden mit z.B. der immunogenen Wirkung von PrP^{Sc} erschwert bzw. unmöglich macht.

Wie oben ausgeführt, können die synthetischen Polypeptide im Minimalfall lediglich aus einer der z.B. im Anspruch 2 oder genannten Sequenzen bestehen. Es ist aber auch möglich, sie mit geeigneten weiteren Sequenzen, die im Folgenden Konformationssequenzen genannt werden, zu verbinden.

Theoretisch wäre es z.B. möglich, z.B. die Sequenzen ggf. über diese Konformationssequenzen und eventuelle weitere Sequenzen dergestalt untereinander zu verbinden, daß die vermutete räumliche Anordnung im PrP^{Sc}-Protein simuliert wird. Im Idealfall würde man auf diese Weise ein Protein mit einer Oberfläche (Epitop) erhalten, in dem wie im PrP^{Sc} mehrere räumlich benachbarte Bindungsstellen enthalten sind.

Erfindungsgemäß ist in einer Ausgestaltung zunächst jedoch vorgesehen, lediglich eine der beanspruchten Sequenzen (Sequenz b) dergestalt mit einer Konformationssequenz zu verknüpfen, daß ein synthetisches Polypeptid mit ausreichender immunogener Bindungswirkung z.B. für 15B3 entsteht, wie Untersuchungen

der Erfinder zeigten. Ein Polypeptid in dieser Ausgestaltung kann eine der beiden folgenden Sequenzen aufweisen:

- j) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-Z-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-(Y)
- k) (X)-Tyr-Tyr-R₃-Pro-R₄-Asp-R₅-Tyr-R₆-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R₁₃)-(Y)

wobei X und Y beliebige Aminosäuresequenzen sind, Z ein üblicher Spacer z.B. Gly-Gly ist, R₃ = Arg oder Lys, R₅ = Gln, Glu oder Arg, R₆ = Ser oder Asn und R₁₃ = Met oder Val ist und die in Klammern gesetzten Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sein müssen.

Die Sequenz j enthält in ihrem C-terminalen Bereich die Sequenz b, die über z.B. den Spacer Gly-Gly mit der sich N-terminal anschließenden Konformationssequenz verbunden ist. In der Sequenz k ist die Abfolge genau umgekehrt. Weitere geeignete Spacer sind generell alle solche Sequenzen, die ausreichende Flexibilität zwischen den verbundenen Peptidbereichen gewährleisten und keinen Einfluß auf die Konformation haben.

Beide bevorzugt eingesetzten synthetischen Polypeptide wurden ausgehend von der Feststellung konzipiert, daß in PrP^{Sc} verstärkt β -Faltblatt-Strukturen auftreten, wobei in aller Regel sequenzauf- oder abwärts eine Konformationssequenz vorliegt, die eine β -Faltblatt-Struktur induziert. Die synthetischen Polypeptide gemäß Anspruch 6 wurden daher mit geeigneten Konformationssequenzen ausgestattet, um die Epitopsequenz in einer für PrP^{Sc}-spezifischen β -Faltblatt-Struktur anzuordnen.

Wie allgemein bekannt, können Aminosäuren in Abhängigkeit von ihrer Größe und ihrer Polarität bzw. Ladung unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden. Man nennt die in eine Gruppe fallenden Aminosäuren untereinander homolog und unterscheidet folgende 5 Gruppen:

- 1.) Kleine aliphatische nicht polare oder nur geringfügig polare Säuren:
Alanin, Serin, Threonin und in Grenzen Glycin, Prolin
- 2.) Polare, negativ geladene Säuren und ihre Amide
Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure und Glutamin
- 3.) Polare, positiv geladene Säuren:
Histidin, Arginin, Lysin
- 4.) Große aliphatische, nicht polare Säuren:
Methionin, Leucin, Isoleucin, Valin, Cystein
- 6.) Große aromatische Säuren:
Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan

In vielen Fällen können in Peptidsequenzen enthaltene Aminosäuren durch entsprechende Säuren aus derselben Gruppe ersetzt werden, ohne daß die Eigenschaften der Sequenz dadurch eine Änderung erfahren. Unter die Erfindung fallen daher auch solche Sequenzen, die nicht den explizit genannten Formeln entsprechen, sondern in denen ein Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren gegen eine homologe Säure vorgenommen wurde.

Weiterhin kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, daß Aminosäuresequenzen unabhängig von ihrer Bildungsrichtung unter bestimmten Umständen ähnliche Bindungseigenschaften, insbesondere Antikörperbindungseigenschaften haben können. Man spricht in diesem Fall von retro-Aminosäuresequenzen und bezeichnet damit übereinstimmende Sequenzen, die in C-oder N-terminaler Richtung gebildet sind (z.B. [N-terminal]-Glu-Ala-Val-Leu-[C-terminal], [N-

terminal]-Leu-Val-Ala-Glu-[C-terminal]). Falls die verwendeten Aminosäuren statt der in Tieren vorkommenden L-Form in der chiralen D-Gegenform vorliegen, so werden die Epitopbereiche spiegelbildlich ausgebildet und ebenfalls von einigen Antikörpern erkannt, wobei sich die Isotypen der Antikörper in diesen Eigenschaften unterscheiden. Man spricht in diesem Fall von inverso-Aminosäuresequenzen. Falls sowohl inverso als auch retro-Aminosäuren verwendet werden, ergeben sich z.B. übereinstimmende Epitopbereiche, die uneingeschränkt von dem zur ursprünglichen Sequenz spezifischen Antikörper gebunden werden. Der Vorteil der Verwendung von z.B. retro-inverso-Aminosäuresequenzen besteht darin, daß D-Aminosäuren vom Organismus langsamer abgebaut werden, da sie von den abbauenden Enzymen schlechter erkannt werden. Der gleiche Effekt kann auch durch die Substitution von nicht natürlichen Aminosäuren erzielt werden. Die erfindungsgemäßen Peptide können daher auch in retro- und/oder inverso Form vorliegen oder weiterhin auch nicht natürliche (also nicht von Organismus produzierte) Aminosäuren enthalten. Nichtnatürliche Aminosäuren lassen sich durch Synthetisierung von z.B. zusätzlichen Seitenketten oder reaktiven Gruppen gezielt mit speziellen Eigenschaften und an bestimmte Anwendungszwecke angepaßt herstellen.

Wie oben ausgeführt, können die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide insbesondere bei der Behandlung, Vorbeugung oder auch Diagnose von Prionerkrankungen eingesetzt werden.

Es ist insbesondere daran gedacht, die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide als Impfstoff darzustellen. Dazu wird z.B. eine ausreichende Menge Peptid mit Freund's komplettem Adjuvans aufgelöst und subkutan oder intramuskulär injiziert. In mehrwöchigen Abständen wird wiederum eine immunogene Menge Peptid in Freund's inkomplettem Adjuvans aufgelöst und injiziert (Boost). Ziel der Impfung ist, eine Immunantwort zu provozieren, die die endogene Produktion

von Antikörpern beinhaltet, die spezifisch PrP^{Sc} erkennen und neutralisieren bzw. kennzeichnen können, so daß körpereigene Abwehrmechanismen einer Erkrankung vorbeugen bzw. den Krankheitsprozeß verlangsamen bzw. stoppen können.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die synthetischen Polypeptide in der Diagnose und Therapie einzusetzen. Nach der herrschenden Konversionstheorie wird davon ausgegangen, daß PrP^{Sc} und/oder PrP^C auch untereinander binden. Gestützt wird diese Annahme durch weitere Mappingversuche der Erfinder, in denen gezeigt wurde, daß (wie aus Fig. 2 zu entnehmen) rekombinantes bovines rbPrP an ähnlichen Sequenzbereichen bindet wie der oben genannte Antikörper 15B3.

Die erwähnten Bindungseigenschaften kann man sich z.B. bei der Therapie zunutze machen. Denkbar wäre, die erfindungsgemäßen Polypeptide in den Körper eines erkrankten Patienten hirngängig zu applizieren und dort dem infektiösen PrP^{Sc} als Bindungspartner zur Verfügung zu stellen. Auf diese Weise könnte man die Konversionsrate möglicherweise drastisch senken und das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen. Zu Diagnosezwecken wäre es denkbar, in Probenmaterial eventuell erhaltenes PrP^{Sc} mittels der erfindungsgemäßen Polypeptide spezifisch zu binden und dann auf geeignete Weise nachzuweisen.

Die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide sind nicht auf die angegebenen Sequenzen beschränkt. Denkbar sind auch Peptide, die in derivatisierter Form vorliegen. Interessant könnte es z.B. sein, solche Peptide mit einem Carrier bzw. Immunogen, wie z.B. Diphtheriatoxid oder BSA zur Verstärkung der Immunantwort zu verbinden. Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung wäre die Verknüpfung mit Markern, wie z.B. Biotin oder Peroxidase bzw. mit Enzymen oder Nukleinsäuren. Denkbar wäre schließlich auch, Signalsequenzen vorzuse-

hen, die die Durchgängigkeit der Peptide in gewünschte Kompartimente erleichtern. Gedacht ist dabei insbesondere an die Blut-Hirn-Schranke, deren Passage durch Verwendung von Signalsequenzen, die z.B. an Transferrinrezeptor binden, erleichtert werden könnten.

Wie oben mehrfach angesprochen, sollen die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide bei der Therapie, Diagnose und Prophylaxe von Prionerkrankungen Verwendung finden. In Verbindung mit allen genannten Anwendungszwecken ist ein wesentliches Element, daß die erfindungsgemäßen Polypeptide einzeln oder in Verbindung mit weiteren Substanzen einem Patienten verabreicht werden, wobei, wie oben ausgeführt, derivatisierte Formen eingesetzt werden können, um die Gängigkeit in bestimmte Kompartimente zu erhöhen.

Die Herstellung der Polypeptide kann auf beliebige Weise erfolgen. Entweder direkt über übliche Peptidsynthese-Techniken oder aber auch indirekt über RNA- oder DNA-Synthese und dann mittels konventioneller molekularbiologischer Techniken. Dementsprechend richtet sich ein weiterer Aspekt der Erfindung auf ein DNA-Molekül, das in der Lage ist, eins der erfindungsgemäßen Polypeptide zu kodieren. Vorzugsweise wird ein solches DNA-Molekül (ggf. auch in einer längeren Sequenz) in einem geeigneten Expressionsvektor zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um Routinetechniken.

Die Erfindung richtet sich weiterhin auch auf einen Kit zur Diagnose von PrP^{Sc} bzw. von Antikörpern gegen PrP^{Sc}, der mindestens eins der erfindungsgemäßen Polypeptide enthält. Man macht sich hierbei die Tatsache zunutze, daß die Polypeptide spezifisch am PrP^{Sc} und an den dagegen gerichteten Antikörpern zu binden vermögen.

Wie oben bereits angesprochen kann eine der zu Ermittlung der Polypeptidsequenzen eingesetzten bindenden Substanzen rekombinantes bovines rbPrP sein. Es hat sich überraschend herausgestellt, daß rekombinantes rbPrP in der Lage ist, spezifisch an PrP^{Sc} zu binden und an der entsprechenden Peptidbank die selben Sequenzen zu erkennen, wie der Antikörper 15B3 (siehe Fig. 2).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft daher die Verwendung von rekombinantem rbPrP-Protein entsprechend der Sequenz in Fig 4. Es hat sich herausgestellt, daß bei Verabreichung von rekombinantem rbPrP mit der angegebenen Sequenz PrP^{Sc}-spezifische Antikörper produziert werden. Diesen Effekt kann man sich insbesondere im Rahmen der Prophylaxe oder Therapie zunutze machen, indem man einem Patienten rekombinantes rbPrP als Impfstoff aufbereitet verabreicht und eine entsprechende Immunantwort auslöst.

Die Ausgestaltung ist selbstverständlich nicht auf die Verwendung von bovinem rbPrP gemäß Fig. 4 beschränkt. Genauso gut können rekombinante PrP-Sequenzen mit artspezifischen Abweichungen von der in Fig. 4 gezeigten rbPrP-Sequenz verwendet werden.

Schließlich betrifft die Erfindung auch noch ein Verfahren zur Herstellung von PrP^{Sc}-spezifischen Antikörpern. Zur Immunisierung wird nicht menschlichen Säugetieren mindestens eins der erfindungsgemäßen Polypeptide in einer zur Immunisierung ausreichenden Dosis verabreicht und der dagegen gebildete Antikörper mit üblichen Methoden isoliert.

Die erfindungsgemäßen Peptide eignen sich schließlich auch zur Verwendung in sogenannten pharmazeutischen oder chemischen Libraries, mit denen neue Wirkstoffe getestet bzw. ermittelt werden, die spezifisch an PrP^{Sc} binden.

M 26-09-98

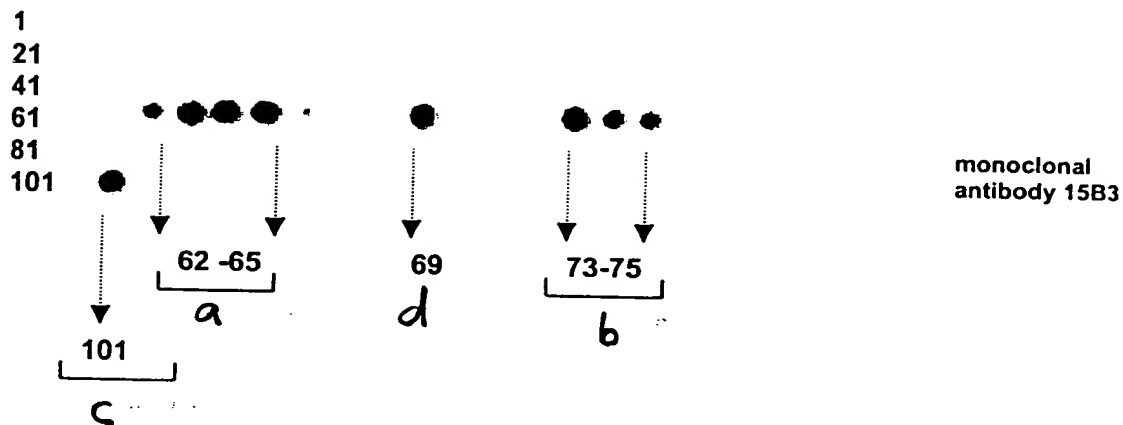


Fig 1

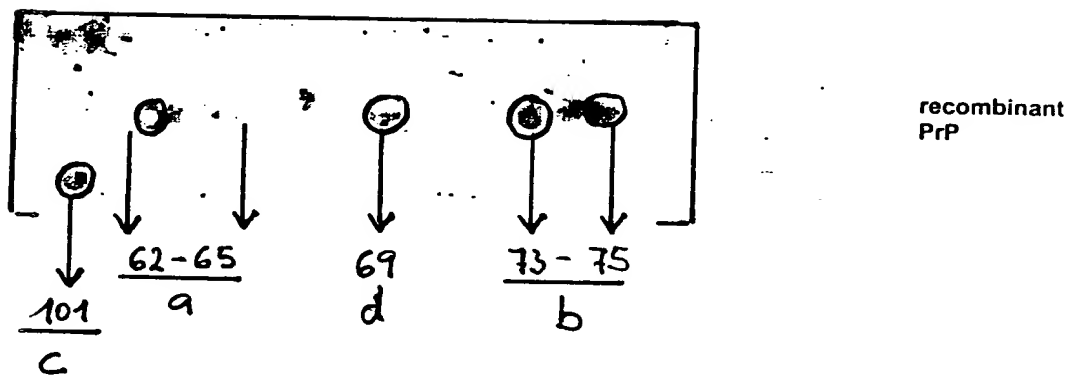


Fig 2

14 28.09.98

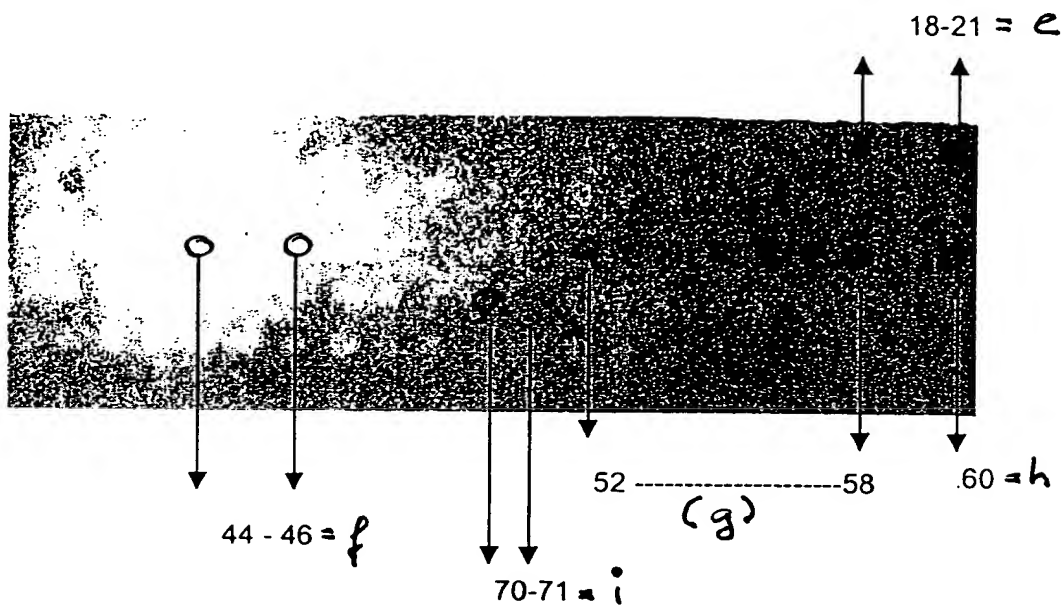


Fig 3

M25.09.00

Met	Lys	Lys	Arg	Pro	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Trp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ser	1	5	10	15
Arg	Tyr	Pro	Gly	Gln	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Asn	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gln	20	25	30	
Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	35	40	45	
His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	50	55	60	
His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	65	70	75	80
Gly	Gly	Thr	His	Gly	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	85	90	95	
Met	Lys	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Val	Val	Gly	Gly	100	105	110	
Leu	Gly	Gly	Tyr	Met	Leu	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Arg	Pro	Leu	Ile	His	115	120	125	
Phe	Gly	Ser	Asp	Tyr	Glu	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Glu	Asn	Met	His	Arg	130	135	140	
Tyr	Pro	Asn	Gln	Val	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Val	Asp	Gln	Tyr	Ser	Asn	Gln	145	150	155	160
Asn	Asn	Phe	Val	His	Asp	Cys	Val	Asn	Ile	Thr	Val	Lys	Glu	His	Thr	165	170	175	
Val	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Gly	Glu	Asn	Phe	Thr	Glu	Thr	Asp	Ile	Lys	180	185	190	
Met	Met	Glu	Arg	Val	Val	Glu	Gln	Met	Cys	Ile	Thr	Gln	Tyr	Gln	Arg	195	200	205	
Glu	Ser	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Gly	Ala	Ser	210	215							

Fig 4

